

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12

Offenlegungsschrift

10

DE 100 55 789 A 1

21

Aktenzeichen:

100 55 789.9

22

Anmeldetag:

10. 11. 2000

43

Offenlegungstag:

6. 6. 2002

51

Int. Cl.⁷:

C 07 K 14/245

C 07 H 21/04

A 61 K 38/16

A 61 K 39/395

A 01 N 63/00

A 61 K 39/108

A 61 P 31/04

Serial No. 10/579,248

Group No. 1752

Confirmation No. 7812

DE 100 55 789 A 1

71

Anmelder:

Pharma-Zentrale GmbH, 58313 Herdecke, DE

74

Vertreter:

Harmsen & Utescher, Rechtsanwälte,
Patentanwälte, 20457 Hamburg

72

Erfinder:

Hacker, Jörg, Prof. Dr., 97218 Gerbrunn, DE;
Blum-Oehler, Gabriele, Dr., 97072 Würzburg, DE;
Jung, Günther, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE;
Hantke, Klaus, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE; Patzer,
Silke, Dr., 71134 Aidlingen, DE; Moreno, Felipe,
Prof. Dr., Madrid, ES; Baquero, Fernando, Prof. Dr.,
28028 Madrid, ES; Baquero, Rosario, Madrid, ES;
Bravo, Daniel, Cerceda, ES; Sonenborn, Ulrich, Dr.,
44799 Bochum, DE; Schulze, Jürgen, Dr., 14558
Bergholz-Rehbrücke, DE; Proppert, Hans, 58095
Hagen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54

DNA-Sequenz und Microcin aus Escherichia coli Stamm DSM 6601

57

Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz mit der in Ab-
bildung dargestellten Nucleotidfolge und das dadurch co-
dierte Peptid, Derivate des Peptids sowie die Verwendung
der DNA-Sequenz, des Peptids sowie der Peptidderivate.

... 100 55 789 A 1

DE 100 55 789 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz und ein neues hierdurch codiertes Microcin aus *Escherichia coli* Stamm DSM 6601.

[0002] *Escherichia coli* ist ein gramnegatives Bakterium, das in der menschlichen und tierischen Darmflora, aber auch extraintestinal vorkommt. *E. coli* tritt in zahlreichen Varianten auf, die sich hinsichtlich der Kapsel-, Oberflächen- und Flagellenantigene unterscheiden und in zahlreiche serologische Typen unterteilt werden können. Die Einordnung nach den Serotypen läßt allerdings keine Aussage über die unterschiedliche Virulenz der Keime zu. Vertreter ein- und desselben Serotyps können sowohl im menschlichen als auch im tierischen Körper ein unterschiedliches Pathogenitätspotential besitzen, das im Extremfall von avirulent bis hochgradig pathogen reichen kann. Der *E. coli* Stamm DSM 6601 gehört zu der Serogruppe O6:K5 und wird als nicht human und nicht tierpathogen bewertet.

[0003] Als Bakteriocine bezeichnet man spezifische Proteine, die von bestimmten Bakterien produziert werden und mit abtötender Wirkung gegen andere Stämme derselben oder einer nahe verwandten Bakterienart gerichtet sind. Es sind bereits über zwanzig Colicine aus *E. coli* bekannt, die jeweils hohe antibakterielle Spezifität aufweisen. Zu den Bakteriocinen zählen auch die sogenannten Microcine, die u. a. auch von bestimmten *E. coli*-Stämmen produziert werden. Bakteriocine werden, abgesehen von ihrer antibiotischen Wirkung, für die Taxonomie von Bakterienstämmen eingesetzt.

[0004] Es war bekannt, daß *E. coli* Stamm DSM 6601 antibiotische Aktivität aufweist, die dem Vorhandensein eines Microcins zugeschrieben wurde, das im folgenden als Microcin M (McmC) bezeichnet wird. Versuche, das Peptid durch Anreicherung aus Flüssigkulturen oder durch Extraktion von Kulturen auf Agarplatten oder aus dem Agar anzureichern, brachten keine verwertbaren Ergebnisse. Es wurde daher versucht, das Microcin mit Hilfe genetischer Methoden zu identifizieren. Mit dem oben genannten Stamm von *E. coli* wurde eine Mu-Mutagenese durchgeführt. Der Phage Mu kann sich nach Infektion einer Bakterienzelle wie ein Transposon verhalten und an einem beliebigen Ort in der DNA integrieren und dadurch eine Mutation hervorrufen. Im vorliegenden Fall wurde der Phage Mud 1 nach der Vorschrift von Casadaban (Casadaban und Cohen, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4530-4533) verwendet. Durch die Mutagenese wurde eine Mutante isoliert, die kein Microcin mehr produzierte. Aus der chromosomalen DNA dieser Mutante wurde das für die Microcinsynthese kodierende DNA-Fragment isoliert und nach Insertion in den Vektor pUC18 und PCR-Amplifikation kloniert und sequenziert.

[0005] Überraschenderweise wurde anhand der Sequenzanalyse festgestellt, daß die mcm-Region aus *E. coli* DSM 6601 einen dem Colicin V ähnlichen Hemmstoff kodiert, der im folgenden Microcin M (McmC) genannt wird. Die Abb. 1 zeigt die entsprechende Sequenz der mcm-Region.

[0006] Die Abb. 1a zeigt in der Übersicht die in diesem Bereich aufgrund der DNA-Sequenz vorhergesagten Gene. Die Genprodukte McmA und McmB zeigen hohe Sequenzähnlichkeit zu den Exportproteinen für Colicin und Microcin 24. Es folgt das Gen mcmI, dessen Produkt nur geringe Ähnlichkeit zu den Immunitätsproteinen der beiden obigen Microcine zeigt. Direkt im Anschluß wird das Microcin M (McmC) kodiert. Das darauf folgende Gen mcmP wird in entgegengesetzter Richtung abgelesen und wirkt aufgrund seiner Homologien zum *cvpA*-Gen (Colicin V Produktion) bei der Expression von McmC mit. Stromauf vom mcmA-Gen liegt das Gen mcmD, dessen Produkt Ähnlichkeit mit den fettsäureübertragenden Proteinen (Transacylasen) aufweist, die auch in die posttranslationale Modifikation der *E. coli*-Hämolyse involviert sind.

[0007] Zur Erläuterung wird darauf hingewiesen, daß das Protein CvaB zur Familie der MDR-Proteine (Multi-Drug-Resistance) gehört, die ATP-abhängig den Export oder Import von kleinen Substanzen, aber auch den Export von Proteinen katalysieren. Es handelt sich um Proteine mit 6 oder 8 hydrophoben Helices in der Membran und einer Domäne mit einer ATP-spaltenden Aktivität, womit der Transportvorgang energetisiert wird. Die ATP-spaltende Aktivität kann auch als separates Protein vorliegen. CvaB und zehn weitere verwandte Proteine besitzen im Gegensatz zu anderen MDR-Proteinen eine N-terminale Domäne mit Cysteinproteinase-Aktivität im Cytoplasma. Diese Proteinase spaltet beim Export eine kleine Leaderpeptidsequenz vom N-terminalen Ende des Colicins V ab und zwar nach der Gly-Gly Erkennungssequenz (siehe Pfeil bei dem Homologieversuch in Abb. 1a). Eine solche Gly-Gly Sequenz findet sich auch in der abgeleiteten Sequenz für das unreife McmC, einem Peptid aus 92 Aminosäuren. Für das reife McmG-Peptid ist somit eine Kettenlänge von 77 Aminosäuren vorgegeben.

[0008] Das Protein CvaA wird über eine alpha-Helix in der Cytoplasmamembran verankert und dient als Verbindungsprotein (Connector) zur äußeren Membran. In der äußeren Membran bindet CvaA an das TolC Protein. Soweit bekannt, bilden die Proteine CvaB, CvaA und TolG einen Proteinkomplex, der den Export von Colicin V über die Cytoplasmamembran und die äußere Membran in einem Schritt katalysiert. Sehr ähnliche Exportapparate hat man z. B. für das *E. coli*-Hämolyse oder für Proteinasen aus *Erwinia*-Arten gefunden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu CvaA und CvaB dürften das McmA und McmB dieselben Funktionen beim Export und bei der Reifung von McmC erfüllen.

[0009] In den nachfolgenden Tabellen ist die prozentuale Identität der Microcine, der Exportproteine und der Immunitätsproteine sowie die prozentuale Identität im Vergleich zu anderen verwandten Proteinen zusammengestellt:

Tabelle 1a

Identität der Microcine im Einzelvergleich in Prozent

	ColV	McmC	Mic24	MicE492
ColV	100	35	19	15
McmC		100	10	28
Mic24			100	45
MicE492				100

Tabelle 1b

Identität der dem CvaA ähnlichen Exportproteine im Einzelvergleich in Prozent

	CvaA	McmA	MtfA
CvaA	100	97	71
McmA		100	71
MtfA			100

Tabelle 1c

Identität der dem CvaB verwandten Exportproteine in Prozent

	CvaB	McmB	MtfB
CvaB	100	89	73
McmB		100	75
MtfB			100

Tabelle 1d

Prozentuale Identität im Vergleich zu anderen McmD verwandten Proteinen. Abkürzungen: HlyCneim ein HlyC ähnliches Protein aus *Neisseria meningitidis*; HlyCec HlyC Protein aus *Escherichia coli*

	McmD	HlyCneim	HlyCec
McmD	100	25	12
HlyCneim		100	11
HlyCec			100

Tabelle 1e

Prozentuale Identität der Immunitätsproteine im Einzelvergleich. Abkürzungen: CvaI – Immunitätsprotein von ColV, McmI – Immunitätsprotein von Microcin MmC, MtfI – Immunitätsprotein von Microcin M24

	CvaI	McmI	MtfI
CvaI	100	23	14
McmI		100	22
MtfI			100

[0010] Aufgrund der DNA-Analyse ergibt sich für die neue Substanz ein Peptid mit 77 Aminosäuren, das aufgrund seiner Größe den Microcinen zugerechnet wird. Dieses reife Microcin (MmC) zeigt aber nur geringe Sequenzhomologie zu bekannten Polypeptiden wie z. B. Colicin V.

[0011] Zur Synthese und zur näheren Untersuchung des Peptids wurden überlappende Oligopeptide mit jeweils fünfzehn Aminosäuren synthetisiert, also 1 bis 15, 5 bis 20, 10 bis 25 usw., und zwar durch Oligopeptidsynthese unter Anwendung der Fmoc-Strategie auf einem Polystyrol-1% Divinylbenzolharz mit 2-Chlortriphenylmethylchlorid als Linker.

[0012] Die Gesamtsynthese des Microcin-Peptids kann in an sich bekannter Weise durch Segmentkondensation auf dem Harz unter Verwendung von drei bis vier Peptid-Segmenten und Einsatz des ABI-Peptidsynthesizers erfolgen, wobei vorzugsweise so vorgegangen wird, daß mit dem an das Harz gebundenen Segment I., bestehend aus den Aminosäuren 77 bis 54, die gereinigten Segmente II. (Aminosäuren 53 bis 24) und III. (Aminosäuren 23 bis 1) gekoppelt werden.

[0013] Die Herstellung von Lipopeptidmischungen zur Gewinnung von Antisera erfolgt in an sich bekannter Weise, wobei Pam₃Cys-Lys-Ser-Peptide zur Immunisierung verwendet werden können.

[0014] Zur Beschichtung von Streptavidinplatten für ELISA-Teste werden in an sich bekannter Weise Biotinyl-Aca-Aca-Peptide verwendet, wobei diese Beschichtungen sowohl mit den entsprechenden Einzelpeptiden als auch mit einer Mischung von Peptiden durchgeführt werden können.

[0015] Im folgenden wird die Erfindung anhand der Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Identifizierung und Sequenzanalyse der mcm-Region aus E. coli DSM 6601

[0016] Nach dem Verfahren von Casadaban et al. wurde eine Mutante, die kein Microcin mehr produzierte, im Platten-test mit dem Indikatorstamm H1941 identifiziert. Chromosomale DNA dieser Mutante wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym HincII verdaut, danach mit dem mittels SmaI geschnittenen Vektor pUC18 ligiert und mit den Primern MuD1 (spezifisch für ein Mu-DNA-Ende) und UNI (spezifisch für den ligierten pUC18 Vektor) in einer PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde nach bekannten Verfahren (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) kloniert und sequenziert. Es stellte sich heraus, daß dieses DNA-Fragment hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Colicin-V-Exportprotein B aufwies. Klonierung und Sequenzanalyse des gesamten Bereiches zeigten, daß diese Region einen dem Colicin V ähnlichen Hemmstoff kodiert.

Beispiel 2

Synthese des Microcins

[0017] Die Aminosäuresequenz des Microcin MmC läßt sich aus der DNA der Region, die dieses Peptid kodiert, ableiten und ergibt sich aus der beigefügten Abb. 3.

[0018] Zur Synthese des Peptids werden in an sich bekannter Weise (G. Jung, Ed.; Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries, Wiley VCH, Weinheim, 1996) Oligopeptide mit fünfzehn Aminosäuren synthetisiert, die überlappend die Aminosäuren 1 bis 15, 5 bis 20, 10 bis 25, 15 bis 30 usw. aufweisen. Die Synthese erfolgt unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen auf einem Polystyrol-1%-Divinylbenzolharz nach dem Merryfield-Verfahren mit 2-Chlortriphenylmethylchlorid als Linker.

[0019] Nach hinreichend langer Synthesedauer werden in den jeweiligen Ansätzen die Peptide vom Harz gelöst und unter Verwendung von HPLC und ES-MS-Spektroskopie untersucht. Die Sekundärstruktur kann zum Teil durch Untersuchung des Circular dichroismus festgestellt werden.

[0020] Die Gesamtsynthese des Peptids aus siebenundsiebzig Aminosäuren erfolgt unter Verwendung eines ABI-Peptidsynthesizers unter Kondensation von Peptidsegmenten auf dem Harz, wobei vorzugsweise mit dem harzgebundenen Peptidsegment I. (Aminosäuren 77 bis 54) angefangen wird und dann die gereinigten Segmente II. (Aminosäuren 53 bis 24) und III. (Aminosäuren 23 bis 1) gekoppelt werden.

[0021] Die freien Peptide können über HPLC gereinigt werden, wobei die Reinheit für die Derivatisierung etwa 90% betragen sollte.

[0022] Für die Derivatisierung zur Herstellung von Lipopeptiden wird nach publizierten Verfahren vorgegangen (K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess; Vaccine 7: 29–33, 1989; G. Jung, K.-H. Wiesmüller, G. Becker, H.-J. Bühring, WG Bessler; Angewandte Chemie [Internat. Ed.] 24: 872–873, 1985). Die Herstellung von für ELISA-Teste geeigneten biotinilierten Peptiden erfolgt ebenfalls nach bereits publizierten Verfahren (G. Jung, Ed.; Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries, Wiley VCH, Weinheim, 1996).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Pharma-Zentrale GmbH

<120> DNA-Sequenz und Microcin aus Escherichia coli Stamm DSM
6601

5

<130> PT66/000

10

<140> DE 10055789.9

<141> 2000-11-10

15

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 5381

<212> DNA

<213> Escherichia coli

25

<400> 1

ataagggaag tagtaatcat gtcttatata agggaaacca tcagaggaaa agatgaatgg 60
 actgttttatg aacagatcgg ttttgcggtc agttgtatgc tctacaatcg taattacagt 120
 ctgtatccgg tgtaaccat tcaatactgg actgaatatg cgatacagca taatcagatt 180
 aaattcctgt ttgattcacg aggttttcca ctggcggtata ttacctgggc atatcttgag 240
 gctgatacag aagcacgcct gctcagggat ccagaattca gggtgcatcc gtctgaatgg 300
 aatgaagatg gaaggatctg gattctggat ttctgttgta aaccaggctt tggtcgaaaa 360
 gttattgact atctcataca gcttcagcca tggggagaag gagaagtacg atgggtaagc 420
 aggcgaaaga aaattgtgac atacatccct gagcggctgc ataaaacgta gtacctctga 480
 agatacagag ataattgtaa attacggggt aatgcatcg ctgatactat tttgacagga 540
 ctctgtatct tctggctttg attatagcat ttcgggttaac cagtgaaggt attacaggaa 600
 aagtgtgagt aagaggagct attttgtttc gtcaggatgc tttagaaaac agaaaaatga 660
 agtggcaggg acgggcaata ttacttcccg gaataccact atgggttaac atgctgggaa 720
 gcatagtgtt tattacggca tttctgatgt tcattattgt tggtagctat agccgccgtg 780
 ttaatgtcag tggtagaggtc acaacctggc caagagctgt caatatatat tcagggtgtac 840
 agggatttgt tgtagggcag tttgttcatg aaggacagtt gataaaaaaa ggggatcctg 900
 tttatctgat tgacatcagt aaaagtacac gtagtggtat tgtagctgat aatcatcgtc 960
 gggatataga aaaccagctg gttagctgtg acaagattat ttcccgtctg gaagaaagta 1020
 aaaaaataac gctggatacc ctggaaaaac aacgcctgca atacacagat gcgtttcgtc 1080
 gctcatcaga tattatacag cgtgcagagg aagggataaa aataatgaaa aacaacatgg 1140
 agaattacag aaactatcag acaaaagggc tgattaataa agatcagtta actaaccagg 1200
 tggcattata ttatcagcaa caaaacaatc ttcttagcct gagcggacag aacgaacaga 1260
 atgccctgca gataaccact ctggagagtc agattcagac tcaggcagca gattttgata 1320
 accgtatcta ccagatggaa ctgcaacggt acgagttaca gaaagaactg gtttaacactg 1380
 atgtggaggg cgaaatcatt atccgggcgt tgactgacgg gaaagttgac tccctgagtg 1440
 tcaactgtcg gcaaatggtc aatcccggag acaaccttct gcagggttatt cctgagaaca 1500
 ttgaaaatta ttatcttatt ctctgggtcc cgaatgatgc tgttccttat atttcggctg 1560

30

35

40

45

50

55

60

65

gtgacaaagt gaatatctgt tatgaagcct ttccggcaga aaaatttggg cagttttctg 1620
 ctacgggttaa aactatatcc aggactcctg catcaacaca ggaaatgttg acctataagg 1680
 gagcaccaca gaatacgccg ggcgcctctg ttccctggta taaagtcatt gcgatgcctg 1740
 5 aaaagcagat tatcagatat gacgaaaaaa acctccctct ggaaaatgga atgaaagccg 1800
 aaagtaçact atttctggaa aaaaggcgta tttaccagtg gatgctttct cttttctatg 1860
 acatgaaaca cagtgaaca ggaccgctca atgactaacg ggaatttcag acaaattata 1920
 10 aatcagcttg atatgcgctg gcgacgtcgt gttccgggta ttcacacagac ggagaccgct 1980
 gaatgtggac tggcctgcct ggcaatgata tgcggtcatt ttggtaagaa tattgacctg 2040
 atatctcttc gtcgtaagtt taatctctcg gcccggtggag caaaccttgc aggaatcaat 2100
 ggaatagcgg agcagctggg gatgatcacc cgggctcttt cactggagct ggatgaactt 2160
 15 ggtgccctca aaatgccgtg tattctccac tgggatttca gtcacttcgt cgtgctggtc 2220
 agcgtaaagc gtaaccgtta tgtactgcat gatccggcca gaggaagaag atatctcggg 2280
 cgggaggaaa tgagccggta ttttacgggc attgcacttg aggtctggcc cggaggtgaa 2340
 20 ttccggacgg aaaccagca aaccgcata agtctccgtt cactgattaa cagtatttac 2400
 ggtattaaaa gaacactggc gaaaattttc tgtctgtcag ctgtaattga agcaatcaat 2460
 ctggtaatgc cgggtgggaac tcagctgggt atggatcatg cgattccggc gggggaccga 2520
 gggctgctga cgcttatttc tgctggcctg atgttcttta tattgctcag ggccgcggtg 2580
 25 agtatgctgc gtgcatggtc etcactgggt atgagcacgc tcatcaatat acagtggcag 2640
 tcgggtctgt ttaaccacct tctcagactg ccgctggcat tttttgaacg ccgtaaatta 2700
 ggtgatatac agtcgcgttt tggctccctt gacactttga gggccacctt taccacctgt 2760
 gtggttgggg caatcatgga cagtattatg gttgtgggtg tttttgtgat gatgctgtta 2820
 30 tatggaggat atcttacctg gatagttctc ggttttacca tggtttacgt tcttattcgt 2880
 ctggtgacat acggctatta ccggcaaata tcggaagaaa ctcttgccag gggggcccg 2940
 gccagctcct attttatgga aagcctgtat ggtattgcca cggtaaaaat ccagggtatg 3000
 35 gtcgggatcc ggggaacaca ctggcttaac ctgaaaatag atgcgatcaa ttcagggtatt 3060
 aagttaacca ggatggattt gctcttcggg ggaataaata cttttgttgc cgcctgtgat 3120
 cagggtggcg ttttatggct ggggtgcaagc cttgtgatcg ataatacagat gacaataggg 3180
 atgtttgtgg catttggttc ttttcgtggg cagttttcgg atcgggttgc ttcgctgacc 3240
 40 agttttcttc ttcaactgag aataatgagt ctgcataatg agcgattgc agatattgca 3300
 ctacatgaaa aggaagaaaa gaaaccggaa attgaaatcg ttgctgacat gagcccgggt 3360
 tcactggaaa ccactgattt aagctaccgg tatgacagcc agtcagcaca ggtattcagt 3420
 ggtctgaatt tgtctgtggc tccgggagaa agtgtggcta taactgggtc ctccgggtgc 3480
 45 ggaaaaacca cattaatgaa agtattatgt ggactgtttg aaccagatag tggaaaagta 3540
 ctggttaatg gcacggatat acgtcaactt ggaataaata attatcaccg tatgatagcc 3600
 tgtgttatgc aggacgaccg gctattttca ggatcaattc gtgaaaatat ctgtgggttt 3660
 50 gcagaagaaa cagacgacga atggatgaca gaatgtgcca gagcaagtca tattcatgat 3720
 gtgataatga aaatgccaat ggggtatgaa acgttaatag gtgaactggg ggaaggctct 3780
 tccggcggtc aaaaacagcg tatattcatt gcccgagctt tataccggaa acctggaata 3840
 ttatttatgg atgaggctac aagtctctct gatacagaaa gtgaacgttt cgttaatgct 3900
 55 gccataaaaa aaatgaatat caccgggtg attattgcac acagagaaac tacgttgaga 3960
 actgttgaca ggattatttc tatttaaaat ccactgggtg aactttgtaa ggagttttgt 4020
 cgatggggga ggtcaagaag gatataaaaa taacagtgat tgcttttgtt atcaattatc 4080
 60 tgttctttta tattccgggtg tcattatata ttagttatta ctatggatat aattttttta 4140
 atctatatat gtttttttta tcaactgtag ttacattttt atcgttgttg ttaaacgtga 4200
 atttttactt cttcacaaat cttatagcga aggtgttgaa atgagaaaac tatctgaaaa 4260
 tgaaataaaa caaatatctg gaggtgacgg gaatgacggg caggcagaat taattgctat 4320
 65 tggttcactt gctggtagct ttattagccc gggatttggt tctattgcag gggcttatat 4380
 aggtgataaa gtacattcat gggcaacgac tgcgacgggt agtccctcca tgtctccctc 4440

aggtatagga ttatcatccc agtttggatc cggcagaggt acatcaagtg cctcttcgtc 4500
 tgcggggagt ggaagttaaa ccttatattg ttaatgaagc acctgttaca ggtgcttcat 4560
 tatatgataa tgggtgcctat gtaacgcttt aagttaggct cctccgaacg tttattatTT 4620 5
 tatgcatacc gcatagtaac aatgccagtc cgtttaattt ttatcatatg agattgtaac 4680
 agaaaatgct ctgttaatga gtataactga tagaagccag atattgtatt cctgctatga 4740
 ctgcattcat cgacatgtga agtaatatgg gcattaacag gccattcgac tttattttttg 4800
 cactaataag aactaacgat accagaaaga gcatcaaaaa tgtatgaaag tcagtatatt 4860 10
 gtagatgtaa tgcagaaaat atgactgatg ttacaatagc agagggtgtaa atattgtcat 4920
 taaaccagaa tttaaaagag ttaaaaagac accctcgaaa tacaatctct tcatatacag 4980
 gaacaagaag tacagaagaa aatatattaa tccataaaat ggctccggaa aaagacattt 5040
 gcgagatcat ccattcttcc gttttcctca ctgccagcag ataagggaca aataactgaa 5100 15
 taatcattat taaagagaaa agagtaaaaa aaacatccag ccgaaaagaa cctcttccta 5160
 atccttctct ttttcggaag aaaataaaat acagtggaac aagaattaga aattcagcaa 5220
 gaaataatgc tggaacaaga agtcccctgg atataagttc ctgcctgttt gtaagaaatg 5280 20
 caggaataaa ggtaatagaa aatgataaag taaacattga aaagcagccg gctgatgact 5340
 gtttttttat agttgcattt ttattttttg tcatttccat t 5381

Patentansprüche 25

1. DNA-Sequenz mit der in **Abb. 1** dargestellten Nucleotidfolge.
2. Verwendung der DNA-Sequenz nach Anspruch 1 in der mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik.
3. Verwendung der DNA-Sequenz nach Anspruch 1 in der Biotechnik als Expressionsvektor oder als Bestandteil von Multi-Copy-Plasmiden zur Herstellung des antimikrobiellen Wirkstoffes. 30
4. Peptid mit der in **Abb. 2** dargestellten Aminosäuresequenz.
5. Verwendung des Peptids nach Anspruch 4 zur Herstellung von Antipeptid-Antikörpern.
6. Verwendung des Peptides nach Anspruch 4 als antimikrobieller Wirkstoff zu mikrobiologischen oder medizinischen Zwecken.
7. Oligopeptide mit den in **Abb. 3** dargestellten Aminosäuresequenzen. 35
8. Verwendung der Oligopeptide nach Anspruch 7 zur Herstellung von Antipeptid-Antikörpern.
9. Verwendung der Oligopeptide nach Anspruch 7 als antimikrobielle Wirkstoffe zu mikrobiologischen oder medizinischen Zwecken.
10. Lipopeptide nach Anspruch 4 oder 7, gekennzeichnet durch Kopplung zu Pam₃Cys-Lys-Ser-Peptiden.
11. Peptide nach Anspruch 4 oder 7, gekennzeichnet durch Kopplung zu Biotinyl-Aca-Aca-Peptiden. 40
12. Verwendung der Lipopeptide nach Anspruch 10 zur Herstellung von Antiseren.
13. Verwendung der Peptide nach Anspruch 11 zur Herstellung von ELISA-Tests.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

- Leerseite -

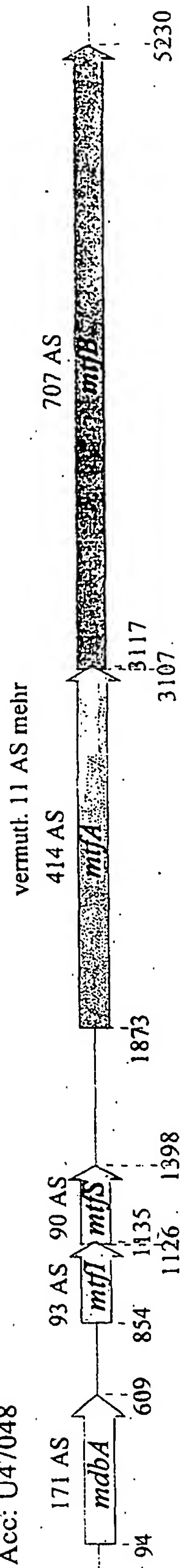
Abbildung 1 Die 5381 Basenpaare lange DNA-Sequenz der kompletten mcm-Region aus E. coli DSM 6601

ID MCM PRELIMINARY; DNA; 5381 BP.
SQ SEQUENCE 5381 BP; 1601 A; 971 C; 1269 G; 1540 T; 0 OTHER;
ATAAGGGAAA TAGTAATCAT GTCTTATATA AGGGAAACCA TCAGAGGAAA AGATGAATGG
ACTGTTTATG AACAGATCGG TTTTGCGGTC AGTTGTATGC TCTACAATCG TAATTACAGT
CTGTATCCGG TGTTAACCAT TCAATACTGG ACTGAATATG CGATACAGCA TAATCAGATT
AAATTCCCTGT TTGATTCACG AGGTTTTCCA CTGGCGTATA TTACCTGGGC ATATCTTGAG
GCTGATACAG AAGCACGCCCT GCTCAGGGAT CCAGAATTCA GGTGTCATCC GTCTGAATGG
AATGAAGATG GAAGGATCTG GATTCTGGAT TTCTGTTGTA AACCAGGCTT TGGTCGAAAA
GTTATTGACT ATCTCATACA GCTTCAGCCA TGGGGAGAAG GAGAAGTACG ATGGTTAAGC
AGGCGAAAGA AAATTGTGAC ATACATCCCT GAGCGGCTGC ATAAAACGTA GTACCTCTGA
AGATACAGAG ATAATTGTAA ATTACGGGGT AAATGCATCG CTGATACTAT TTTGACAGGA
CTCTGTATTT TCTGGCTTTG ATTATAGCAT TTCGGTTAAC CAGTGAAGGT ATTACAGGAA
AAGTGTGAGT AAGAGGAGCT ATTTTGTTC GTCAGGATGC TTTAGAAAAC AGAAAAATGA
AGTGGCAGGG ACGGGCAATA TTAATCCCG GAATACCACT ATGGTTAATC ATGCTGCGAA
GCATAGTGTT TATTACGGCA TTTCTGATGT TCATTATTGT TGGTACCTAT AGCCGCCGTG
TTAATGTCAG TGGTGAGGTC ACAACCTGGC CAAGAGCTGT CAATATATAT TCAGGTGTAC
AGGGATTTGT TGTCAGGCAG TTTGTTTCATG AAGGACAGTT GATAAAAAAA GGGGATCCTG
TTTATCTGAT TGACATCAGT AAAAGTACAC GTAGTGGTAT TGTCACTGAT AATCATCGTC
GGGATATAGA AAACAGCTG GTTCGTGTGG ACAAGATTAT TTCCCGTCTG GAAGAAAGTA
AAAAAATAAC GCTGGATACC CTGGAATAAC AACGCCTGCA ATACACAGAT GCGTTTCGTC
GCTCATCAGA TATTATACAG CGTGCAGAGG AAGGGATAAA AATAATGAAA AACAACATGG
AGAATTACAG AAACATACAG ACAAAGGGC TGATTAATAA AGATCAGTTA ACTAACCAGG
TGGCATTATA TTATCAGCAA CAAAACAATC TTCTTAGCCT GAGCGGACAG AACGAACAGA
ATGCCCTGCA GATAACCACT CTGGAGAGTC AGATTCAGAC TCAGGCAGCA GATTTTGATA
ACCGTATCTA CCAGATGGAA CTGCAACGGT ACGAGTTACA GAAAGAACTG GTTAACACTG
ATGTGGAGGG CGAAATCATT ATCCGGGCGT TGACTGACGG GAAAGTTGAC TCCCTGAGTG
TCACTGTCGG GCAAATGGTC AATCCCGGAG ACAACCTTCT GCAGGTTATT CCTGAGAACA
TTGAAAATTA TTATCTTATT CTCTGGGTCC CGAATGATGC TGTTCTTAT ATTTCCGGCTG
GTGACAAAGT GAATATTCGT TATGAAGCCT TTCCGGCAGA AAAATTTGGG CAGTTTCTG
CTACGGTTAA AACTATATCC AGGACTCCTG CATCAACACA GGAAATGTTG ACCTATAAGG
GAGCACCACA GAATACGCCG GCGCCTCTG TTCCCTGGTA TAAAGTCATT GCGATGCCCTG
AAAAGCAGAT TATCAGATAT GACGAAAAAA ACCTCCCTCT GGAAATGGA ATGAAAGCCG
AAAGTACACT ATTTCTGGAA AAAAGGCGTA TTTACCAGTG GATGCTTTCT CTTTCTATG
ACATGAAACA CAGTGCAACA GGACCGCTCA ATGACTAACG GGAATTTTCTG ACAAATTATA
AATCAGCTTG ATATGCGCTG GCGACGTCGT GTTCCGGTTA TTCATCAGAC GGAGACCGCT
GAATGTGGAC TGGCCTGCCCT GGCATGATA TGCGGTCAAT TTGGTAAGAA TATTGACCTG
ATATCTCTTC GTCGTAAGTT TAATCTCTCG GCGGTGGAG CAAACCTTGC AGGAATCAAT
GGAATAGCGG AGCAGCTGGG GATGATCACC CGGGCTCTTT CACTGGAGCT GGATGAACCT
GGTGGCCTCA AAATGCCGTG TATCTCCAC TGGGATTTCA GTCACCTCGT CGTGTGCTG
AGCGTAAAGC GTAACCGTTA TGTACTGCAT GATCCGGCCA GAGGAAGAG ATATCTCGGT
CGGGAGGAAA TGAGCCGGTA TTTTACGGG ATTGCACTTG AGGTCTGGCC CGGAGGTGAA
TTCCGGACGG AAACCCAGCA AACCCGCATA AGTCTCCGTT CACTGATTAA CAGTATTTAC
GGTATTAAA GAACACTGGC GAAATTTTTC TGTCTGTCAG CTGTAATTGA AGCAATCAAT
CTGGTAATGC CGGTGGGAAC TCAGCTGGTT ATGGATCATG CGATTCCGGC GGGGACCGA
GGCTGCTGA CGCTTATTTT TGCTGGCCTG ATGTTCTTTA TATTGCTCAG GGCCGCGGTG
AGTATGCTGC GTGCATGGTC CTCACTGGTT ATGAGCACGC TCATCAATAT ACAGTGCCAG
TCGGGTCTGT TTAACCACTT TCTCAGACTG CCGCTGGCAT TTTTGAACG CCGTAAATTA
GGTGATATCC AGTCGCGTTT TGGCTCCCTT GACACTTTGA GGGCCACCTT TACCACCTGT
GTGGTTGGGG CAATCATGCA CAGTATTATG GTTGTGGGTG TTTTGTGAT GATGCTGTTA
TATGGAGGAT ATCTTACCTG GATAGTTCTC GGTTTTACCA TGGTTTACCT TCTTATTCGT
CTGGTGACAT ACGGCTATTA CCGGCAATA TGGGAAGAAA CTCTTGTCAG GGGGGCCCCG
GCCAGCTCCT ATTTTATGGA AAGCCTGTAT GGTATTGCCA CGGTAAAAAT CCAGGSTATG
GTCCGGATCC GCGGAACACA CTGGCTTAAC CTGAAATAG ATGCGATCAA TTCAGGTATT
AAGTTAACCA GGATGGATTT GCTCTTCGGG GGAATAATA CTTTGTGTTG CCGCTGTGAT
CAGGTGGCGA TTTTATGGCT GGTGCAAGC CTGTGTATCG ATAATCAGAT GACAATAGGG
ATGTTTGTGG CATTTGGTTC TTTTCGTGG CAGTTTTCGG ATCGGGTTGC TTCGCTGACC
AGTTTCTCTC TTCAACTGAG AATAATGAGT CTGCATTAAT AGCGCATTCG AGATATTGCA
CTACATGAAA AGGAAGAAA GAAACCCGAA ATTGAAATCG TTGCTGACAT GAGCCCGGTT
TCACTGGAAA CCACTGATTT AAGCTACCGG TATGACAGCC AGTCAGCACA GGTATTCAGT
GGTCTGAATT TGTCTGTGGC TCCGGGAGAA AGTGTGGCTA TAACTGGTGC CTCCGGTGGC
GGAAAAACCA CATTAATGAA AGTATTATGT GGAATGTTT AACCAGATAG TGGAAAAGTA
CTGGTTAATG GCACGGATAT ACGTCAACTT GGAATAAATA ATTATCACCG TATGATAGCC
TGTGTTATGC AGGACGACCG GCTATTTTCA GGATCAATTC GTGAAAATAT CTGTGGGTTT
GCAGAAGAAA CAGACGACGA ATGGATGACA GAATGTGCCA GAGCAAGTCA TATTCATGAT
GTGATAATGA AAATGCCAAT GGGGTATGAA ACGTTAATAG GTGAAGTGGG GGAAGGTCTT
TCCGGCGGTC AAAACACGCG TATATTCATT GCCCGAGCTT TATACCGGAA ACCTGGAATA
TTATTTATGG ATGAGGCTAC AAGTTCTCTT GATACAGAAA GTGAACGTTT CGTAAATGCT

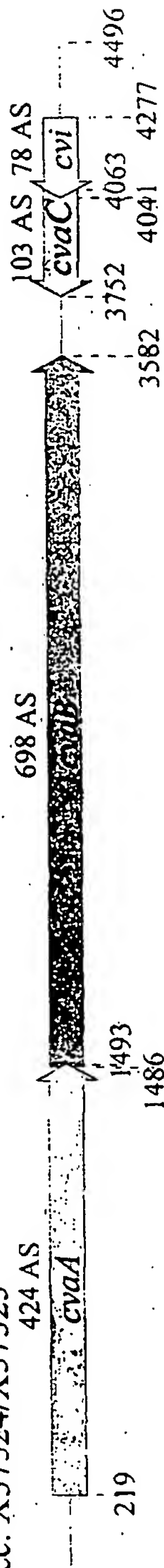
GCCATAAAAA AAATGAATAT CACCCGGGTG ATTATTGCAC ACAGAGAAAC TACGTTGAGA
ACTGTTGACA GGATTATTTT TATTTAAAAAT CCACTGGTGT AACTTTGTAA GGAGTTTGT
CGATGGGGGA GGTCAAGAAG GATATAAAAA TAACAGTGAT TGCTTTTGTT ATCAATTATC
TGTTCTTTTA TATCCCGGTG TCATTATATC TTAGTTATTA CTATGGATAT AATTTTTTTA
ATCTATATAT GTTTTTTTTA TCACTTGTAG TTACATTTTT ATCGTTGTGG TTAAACGTGA
ATTTTTACTT CTTCACAAAT CTTATAGCGA AGGTGTTGAA ATGAGAAAAC TATCTGAAAA
TGAAATAAAA CAAATATCTG GAGGTGACGG GAATGACGGG CAGGCAGAAT TAATTGCTAT
TGGTTCACCT GCTGGTACGT TTATTAGCCC GGGATTTGGT TCTATTGCAG GGGCTTATAT
AGGTGATAAA GTACATTCAT GGGCAACGAC TGCGACGGTT AGTCCCTCCA TGTCTCCCTC
AGGTATAGGA TTATCATCCC AGTTTGGATC CGGCAGAGGT ACATCAAGTG CCTCTTCGTC
TGCGGGGAGT GGAAGTTAAA CCTTATATTG TTAATGAAGC ACCTGTTACA GGTGCTTCAT
TATATGATAA TGGTGCCTAT GTAACGCTTT AAGTTAGGCT CCTCCGAACG TTTATTATTT
TATGCATACC GCATAGTAAC AATGCCAGTC CGTTTAATTT TTATCATATG AGATTGTAAC
AGAAAATGCT CTGTTAATGA GTATAACTGA TAGAAGCCAG ATATTGTATT CCTGCTATGA
CTGCATTCAT CGACATGTGA AGTAATATGG GCATTAACAG GCCATTTCGAC TTTATTTTTG
CACTAATAAG AACTAACGAT ACCAGAAAGA GCATCAAAAA TGTATGAAAG TCAGTATATT
GTAGATGTAA TGCAGAAAAT ATGACTGATG TTACAATAGC AGAGGTGTAA ATATTGTCAT
TAAACCAGAA TTTAAAAGAG TTAAAAAGAC ACCCTCGAAA TACAATCTCT TCATATACAG
GAACAAGAAG TACAGAAGAA AATATATTAA TCCATAAAAT GGCTCCGGAA AAAGACATTT
GCGAGATCAT CCATTCTTCC GTTTTCCTCA CTGCCAGCAG ATAAGGGACA AATAACTGAA
TAATCATTAT TAAAGAGAAA AGAGTAAAAA AAACATCCAG CCGAAAAGAA CCTCTTCCTA
ATCCTTCTCT TTTTCGGAAG AAAATAAAAT ACAGTGAAC AAGAATTAGA AATTCAGCAA
GAAATAATGC TGGAACAAGA AGTCCCCTGG ATATAAGTTC CTGCCTGTTT GTAAGAAATG
CAGGAATAAA GGTAATAGAA AATGATAAAG TAAACATTGA AAAGCAGCCG GCTGATGACT
GTTTTTTTAT AGTTGCATTT TTATTTTTTG TCATTTCCAT T

Abbildung 1a: Organisation des Gen-Clusters der mcm-Region aus E. coli DSM 6601 mit den für die Microcin-Synthese, -Prozessierung und -Ausscheidung notwendigen Genabschnitten (unten) und Vergleich mit den Gen-Clustern für die Produktion von Microcin 24 (oben) und Colicin V (mitte)

Microcin 24 Acc: U47048



Colicin V Acc: X57524/X57525



Microcin M aus E. coli DSM 6601

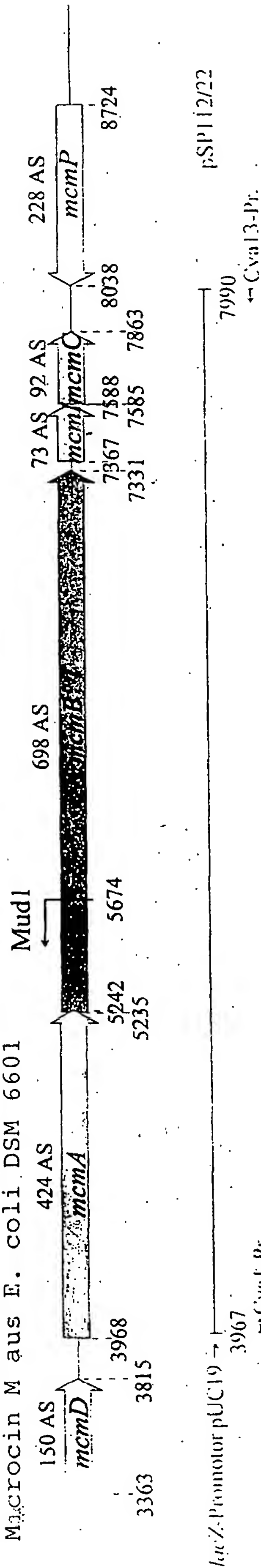


Abbildung 2 Aminosäuresequenz des antimikrobiellen Peptids
(Microcin M, MmcC) aus E. coli DSM 6601

Protein 1	DGNDGQAELIAIGSLAGTFISPGFGSIAGAYIGDKVHS WATTATVSPSMSPSGIGLSSQFGSGRGTSSASSSAGSGS
------------------	---

Abbildung 3 Überlappende Oligopeptide (Teilsequenzen) aus
dem antimikrobiellen Peptid (Microcin M, MmcC)
aus E. coli DSM 6601

Peptide	Mol. Weight (mol/g)	Weight (mg)	mmol	Mixture	Protein
1. DGNDGQAELIAIGSLA	1543.7	0.46	0.0003	M.1	1
2. GQAELIAIGSLAGTFI	1560.8	0.47	0.0003	M.1	1
3. LAIGSLAITFISPGFG	1507.8	0.45	0.0003	M.1	1
4. LAGTFISPGFGSIAGA	1465.7	0.44	0.0003	M.1	1
5. ISPGFGSIAGAYIGDK	1552.8	0.47	0.0003	M.1	1
6. GSIAGAYIGDKVHSWA	1631.8	0.49	0.0003	M.1	1
7. AYIGDKVHSWATTATV	1719.9	0.52	0.0003	M.1	1
8. KVHSWATTATVSPSMS	1689.9	0.51	0.0003	M.1	1
9. ATTATVSPSMSPSGIG	1463.6	0.44	0.0003	M.1	1
10. VSPSMSPSGIGLSSQF	1580.8	0.47	0.0003	M.1	1
11. SPSGIGLSSQFGSGRG	1493.6	0.45	0.0003	M.1	1
12. GLSSQFGSGRGTSSAS	1485.6	0.45	0.0003	M.1	1
13. FGSGRGTSSASSSAGS	1402.4	0.42	0.0003	M.1	1
14. SGRGTSSASSSAGSGS	1342.3	0.40	0.0003	M.1	1